

**ZUR GELCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG DER EISENBINDUNG
IM SERUM**

Martin Gulde

—
1976
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0091

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK - INNENSTADT - DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR.MED. E. BUCHBORN

ZUR GELCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG DER EISENBINDUNG
IM SERUM

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

MARTIN GULDE
AUS BERLIN

1976

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.P.C.Scriba
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1976



Für Ch., B. und K.

Ich danke Herrn Professor Dr.med. P.C.Scriba
für die Überlassung des Themas und für seine
stete Bereitschaft zur Hilfe und Kritik.

Frau F. Haag möchte ich für die Anfertigung
der Abbildungen herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1.	Transferrin und Eisenbindungs- kapazität	1
1.1.1.	Klinische Bedeutung	2
1.1.2.	Bestimmung der Eisenbindungs- kapazität	3
1.1.3.	Bestimmung des Serumeisens	4
1.1.4.	Quantitative immunologische Transferrinbestimmung	4
1.2.	Fragestellung	5
<u>2.</u>	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	6
2.1.	Material	6
2.2.	Methodik	7
2.2.1.	Bestimmung des Ausschlußvolumens	8
2.2.2.	Bestimmung des inneren Volumens	9
<u>3.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	11
3.1.	Filtration von wässriger ⁵⁹ Eisen- III-chlorid-Lösung unter Verwendung verschiedener Dextrangele	11
3.1.1.	Elution mit Natriumphosphatpuffer	11
3.1.2.	Elution mit Veronalpuffer	11
3.1.3.	Elution mit Tris-HCl-Puffer	12
3.1.4.	Rechromatographie	15
3.1.5.	Chargenvergleich	16
3.2.	Elution von Serum nach Inkubation mit ⁵⁹ Eisen-III	18
3.2.1.	Zur Ansatzberechnung	18
3.2.2.	Untersuchung verschiedener Geltypen	18
3.2.3.	Säureelution und Ausbeute	19
3.2.4.	Proteinbindung und Inkubations- bedingungen	23

	Seite
3.2.5. Serumverdünnung und Elution auf Sephadex G-50 f	23
3.2.6. Serumverdünnung und Elution auf Sephadex G-15	26
3.2.7. Inkubation von Serum mit markiertem und nichtmarkiertem Eisen-III	27
<u>4. DISKUSSION</u>	32
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	36
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	37

1.

EINLEITUNG

1.1. Transferrin und Eisenbindungskapazität

Transferrin ist ein Protein der β_1 -Globulin-Fraktion des Serums mit einem Molekulargewicht um 88000 (1, 10, 14, 44). In seiner Funktion als Transportprotein für Eisen besitzt jedes Molekül zwei Bindungsstellen. Die Art der Metallbindung an das Protein ist noch nicht endgültig geklärt (1, 2, 14, 15). Die Bindung ist pH-abhängig und bildet beim physiologischen pH des Blutes einen sehr stabilen Komplex. So liegt die Affinitätskonstante für die beiden Eisenbindungsstellen in der Größenordnung von 10^{30} (1, 17). pH-Erniedrigung oder -Erhöhung führt zu Abspaltung des Eisens, bei pH 5 ist die Dissoziation vollständig (26).

Die biologische Funktion des Transferrins als Transportprotein im Serum hängt eng mit dem Ausmaß seiner Eisensättigung zusammen, wobei auch die veränderliche Transferrinkonzentration selbst eine Rolle spielt (11, 14, 15, 16, 17, 34, 44). Die normale Absättigung beträgt etwa 30%. Es stehen also mehr Bindungsstellen als Eisenatome im normalen Serum zur Verfügung, wodurch im Wesentlichen (17, 21) das Vorkommen freien Eisens und auch dessen Verlust durch Ausscheidung im Urin verhindert wird (53). Bereits sehr kleine Mengen ungebundenen Eisens wirken toxisch (17, 44). Die Transferrin-Eisen-Moleküle sind nicht einheitlich, sondern unterscheiden sich voneinander insofern, als Moleküle mit zwei oder einem Eisenatom existieren und diese wiederum von den beiden Bindungsstellen die erste oder zweite Stelle belegen. Erst hierdurch ist es dem Trägerprotein über die Kontaktaufnahme mit der Zelloberfläche möglich, differenziert dem Eisenbedarf der einzelnen Gewebe ebenso wie dem Einfluß auf Absorption und Speicherung gerecht zu werden (14, 15, 18, 34).

Die diagnostische Aussage im klinischen Bereich resultiert aus der Beurteilung des transferringebundenen Eisens in Form des Serumeisenspiegels und der Transferrinkonzentration des Serums,

sowie deren Verhältnis zueinander. Dabei wurde, für klinische Erfordernisse ausreichend, dem Transferringehalt die totale Eisenbindungskapazität (TEBK) des Serums gleichgesetzt, die durch Eisenbestimmung nach vollständiger Absättigung des Trägerproteins erfaßt werden kann (7, 10, 35, 53). Die Differenz gegenüber dem normalen Serumeisenspiegel ergibt die ungesättigte Eisenbindungskapazität (UEBK), die den Sättigungsgrad des Transferrins repräsentiert.

1.1.1. Klinische Bedeutung

Eine Verminderung der Transferrinkonzentration bzw. der Eisenbindungskapazität des Serums findet sich bei neoplastischen Erkrankungen, bei akut und chronisch entzündlichen Erkrankungen (17), hämolytischen Syndromen, bei nephrotischem Syndrom, exsudativer Gastroenteropathie, bei chronischen Lebererkrankungen einschließlich der fortgeschrittenen Hämochromatose (25), sowie bei kongenitalen und erworbenen Hypotransferrinämien. - Soweit diese Erkrankungen nicht von einem Eisenmangel begleitet sind, ist eine Erhöhung der EBK bei allen sonstigen Eisenmangelsituationen (27) zu finden, z.B. in erster Linie als Folge akuter oder chronischer Blutverluste. Auch bei Gravidität, Einnahme von Ovulationshemmern und bei akuter Hepatitis wurde eine Erhöhung der EBK beobachtet (15, 22, 33, 38, 41, 44).

Im wesentlichen sind also die Eisenmangelsituationen durch eine Zunahme der EBK gekennzeichnet, woraus sich diagnostisch vor allem die Abgrenzung gegenüber Neoplasie und Infektion ergibt. Daneben können nach HAUSMANN et al. (22) sowie HEILMEYER und HARWERTH (27) TEBK und UEBK zur quantitativen Erfassung des Eisenmangels im Sinne einer Stadieneinteilung beitragen. Prälatenter, latenter und manifester Eisenmangel erfordern eine unterschiedliche Dosierung der Eisenkompensationstherapie (29).

1.1.2. Bestimmung der Eisenbindungskapazität

Der Bedeutung des Transferrins entsprechend gibt es eine ganze Reihe von Bestimmungsmethoden, die hier nur im Prinzip dargestellt werden sollen. - Allen diesen Bestimmungsmethoden der EBK gemeinsam ist die Absättigung des Serums mit einem Überschuß an Eisen-III. Der Untersuchungsgang kann unterschiedlich fortgesetzt werden.

Einmal wird ein Eisenchromogen zur Chelatbildung mit dem zuvor reduzierten Eisenüberschuß zugesetzt und nach dessen kolorimetrischer Bestimmung durch Abzug des Ergebnisses vom Nullwert (kein Serum) die UEBK indirekt ermittelt. Als ausreichend empfindliche Chromogene werden allgemein Bathophenthrolin (30, 48, 59), das alkohol- und wasserlöslich ist, TPTZ (Tripyridyl-s-triazin) (8) und Ferrozin (11) verwendet.

Bei allen übrigen Bestimmungen wird zunächst das ungebundene Eisen aus dem Serum entfernt. Wiederum nach Zugabe eines Chromogens ergibt nach Abtrennung des Transferrins (mit und ohne nachfolgende Fällung, s.u.) die kolorimetrische Bestimmung des Transferrineisens direkt die TEBK. Direkt wird diese auch bei Verwendung des Radioisotops ⁵⁹Eisen-III in der Sättigungslösung ermittelt, wobei sich nach Abtrennung des ungebundenen Eisens eine Fällung des Proteins erübrigt. Außerdem berechnet sich aus dem Verhältnis von gebundenem zu zugesetztem markiertem Eisen die UEBK direkt (4, 6, 9, 10, 20, 23, 24, 36, 40, 55).

Die Entfernung des ungebundenen Eisenanteils aus dem Serum geschieht bei der Mehrzahl der Methoden durch Adsorption an unlösliche Substanzen, wie Anionenaustauscher-Harze (12, 23, 24, 30, 48, 55, 63), Magnesiumkarbonat (5, 6, 8, 12, 35, 47, 50, 52, 61) oder aktivierte Holzkohle (9, 31, 40). Zahlreiche Untersuchungen befassten sich mit dem Vergleich dieser Adsorbentien im einzelnen wie auch mit deren Anwendung bei verschiedenen Bestimmungsmethoden der EBK (9, 10, 20, 40, 56). Eine ausführliche Darstellung der methodischen Schwierigkeiten bei Verwendung von Adsorbentien findet sich bei COOK (9, 10) und LEHMANN et al. (40).

Eine Abtrennung des ungebundenen Eisenanteils vom Serum wird, zum Teil unter Umgehung dieser Schwierigkeiten, auch durch Ultrafiltration (40) und Gelfiltration (4, 45) erreicht.

1.1.3. Bestimmung des Serumeisens

Neben der photometrischen Bestimmung des Serumeisens kommt im klinischen Bereich auch die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) zunehmend zur Anwendung, die eine größere Spezifität und Genauigkeit besitzt und grundsätzliche Nachteile der Spektrophotometrie ausschließt (47, 51, 56, 60).

Bei der photometrischen Bestimmung ist immer eine Lösung des Eisens vom Transportprotein notwendig, die durch Azidifizierung (47, 56) oder mit Hilfe eines Detergenz (6, 10, 20, 35) bewirkt wird. Größere Genauigkeit und Verlässlichkeit kann prinzipiell durch nachfolgende Fällung mit Trichloressigsäure erzielt werden (10, 35, 51, 58), jedoch kann dies auch zum Einschluß von Eisen in das gefällte Protein führen oder im Zusammenhang mit der erforderlichen Reduktion des Eisens vor Bildung des Farbkomplexes eine Fehlerquelle darstellen (8, 10, 48, 59).

Die AAS bietet ebenfalls die Möglichkeit der direkten Eisenbestimmung im Serum durch direkte, unverdünnte oder verdünnte Probenaufnahme. Zur Vermeidung der AAS-spezifischen Probleme (51, 56, 60) wurden die verschiedensten Methoden entwickelt (28, 56, 57, 58). Den störenden Einfluß der Hämolyse (46, 47, 48, 51, 58, 63) auszuschalten, ermöglicht jedoch nur die indirekte Messung des Eisens nach Lösung seiner Proteinbindung und gegebenenfalls Fällung des Proteins (59), wiederum vielfach modifiziert (47, 51, 63). Vergleichbare Mikromethoden gibt es seit Anwendung der flammenlosen AAS im klinischen Betrieb (46, 61).

1.1.4. Quantitative immunologische Transferrinbestimmung

Zur quantitativen immunologischen Bestimmung der Serumproteine auf der Grundlage der Antigenantikörperreaktion eignet sich für klinische Bedürfnisse besonders die radiale Immunodiffusion (43) wegen ihrer einfachen Handhabung und relativ raschen Durchführbarkeit.

Eine Übersicht zu Grundlagen und Methodik findet sich bei LAMERZ und FATEH-MOGHADAM (37, 38). Die Einfachheit der radialen Immunodiffusion hat sich auch in der Fertigung entsprechender käuflicher Testansätze niedergeschlagen. Zusätzlich wurden verbesserte Auswertungsverfahren entwickelt (38).

1.2. Fragestellung

Von den Möglichkeiten, die EBK im Serum zu erfassen, bietet sich wegen ihrer Einfachheit die direkte Bestimmung der UEBK und TEBK bei Verwendung von markiertem Eisen zur Absättigung des Serums an. Mit der Isotopenmethode sollten die Bedingungen für die Fraktionierung eines mit Eisen gesättigten Serums nach dem Prinzip der Säulenchromatographie (19) geprüft werden. Es lag dabei letztlich die Absicht einer Automatisierung der Bestimmung zugrunde, wie sie in unserer Klinik bei der routinemäßigen Hormonbestimmung mit Hilfe der simultanen Säulenchromatographie seit langem üblich ist (32).

2.1. Material

Serum:

Zur Gewinnung eines Serumpools wurden Restseren gesunder Patienten aus dem Zentrallabor der Klinik ausgesucht und tiefgefroren.

Davon kamen zwei Mischseren mit einer UEBK von 200 µg/100 ml und 250 µg/100 ml zur Anwendung, also innerhalb des Normbereichs von 100-300 µg/100 ml (12, 22, 53).

Pufferlösungen:

Zur Herstellung der folgenden Pufferlösungen dienten die Literaturangaben nach (12) : 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7.4 und pH 8.0, 0.05 mol/l Veronalpuffer pH 7.4 und 0.05 mol/l Tris-HCl-puffer pH 7.4 und pH 8.0.

Weiterhin wurde zur Elution 0.02 mol/l Salzsäure benutzt.

⁵⁹Eisen-III-chlorid und Natrium-¹²⁵Jodid:

Das radioaktive Nuklid ⁵⁹Eisen in Form des ⁵⁹Eisen-III-chlorids stammte von Fa. Byk-Mallinckrodt, Frankfurt/M. Die Stammlösung von 1 ml verblieb im Originalgefäß, mit Aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt und im Kühlraum aufbewahrt. Gleiches gilt für Natrium-¹²⁵Jodid von Fa. Hoechst, Frankfurt/M. Die insgesamt vier verwendeten Chargen von ⁵⁹Eisen-III-chlorid unterschieden sich zum Teil beträchtlich durch ihre spezifischen Aktivitäten, die zwischen 12.7 und 46.2 mCi/mg lagen.

Eisen-III-ammoniumsulfat:

Als nichtmarkiertes Eisen wurde Eisen-III-ammoniumsulfat in standardisierter Konzentration von 25.0 µg/ml von Fa. Merck, Darmstadt, verwendet (Merckotest 3313).

Dextrangele:

Die folgenden Dextrangele der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden, wurden zur Chromatographie benutzt:

Sephadex G-10, G-15, G-25 und G-50 fine (f) und superfine (sf). Die Geltrockensubstanzen wurden jeweils vor Anwendung über Nacht zur Quellung in Aqua bidest. angesetzt.

2.2.

Methodik

Säulenherstellung:

Als Säulen dienten die Zylinder von 5 ml- (Fa. Braun, Melsungen) und 10 ml-Einmal-Spritzen (Fa. Terumo über Fa. Sartorius Membranfilter KG, Göttingen) mit zentralem Auslauf. Den Auslauf und nach Füllung der Säule auch die Geloberfläche deckte ein feinporiger Membranfilter (Fa. Sartorius Membranfilter KG, Göttingen) ab. Die Füllung mit der entsprechenden Menge Dextrangel-Wassersuspension erfolgte bei geschlossenem Auslauf. Nach Sedimentation konnte der Wasserüberstand ablaufen und nach Spülung mit Elutionslösung war die wiederum verschlossene Säule zum Auftrag des Probenansatzes fertiggestellt.

Chromatographie:

Das Ansatzgemisch wurde stets mit einem Überschuß des jeweils zur Elution verwendeten Puffers versetzt und hiervon 0.5 ml auf die vorgespülte Säule aufgetragen. Die Elution besorgte eine Peristaltikpumpe (Fa. Ismatec, Zürich), die bei Gebrauch eines zugehörigen Schlauchsystems (orange-orange Markierung) ein Volumen von 0.42 ml pro Minute förderte. Die Sammlung des Eluats erfolgte in Zweiminutenfraktionen, nur bei Nachelution mit Salzsäure in Fünfminutenfraktionen.

Messung der Radioaktivität:

Die Aktivitätsmessung erfolgte im Gamma-Zähler (Gamma-Guard, Fa. Tracerlab, Köln). Die Strahlungsenergie von ^{125}Jod wurde direkt bei 0.035 MeV in einem Bereich von 0.0325 bis 0.045 MeV erfaßt. Da das Gerät auf Messung einer maximalen Energie von 1 MeV ausgelegt war, mußte für ^{59}Fe durch Reduktion der Verstärkung das Energiespektrum halbiert und dem Meßbereich angeglichen werden. So konnten die beiden bedeutsamen Peaks bei 1.10 und 1.29 MeV im Bereich von 0.490 bis 0.660 MeV gemessen werden.

2.2.1. Bestimmung des Ausschlußvolumens

Die Elution von Serumproteinen, deren Abtrennung beabsichtigt war, wurde durch Bestimmung der Proteine verfolgt und erlaubte zugleich die Abgrenzung des sogenannten Ausschlußvolumens oder äußeren Volumens. Die hierfür erforderliche freie Passage der Serumproteine durch das Gelbett unter Ausschluß der einzelnen Gelpartikel gewährleistete bei größtmöglicher Porengröße die Wahl von Sephadex G-50. Das heißt, die Ausschlußgrenze dieses Gels entsprechend einem Molgewicht bis 30 000 bleibt unter dem Molgewicht der Serumproteine bzw. des Transferrins.

Nach Elution von je 0.5 ml Mischserum mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer auf einer 5 ml- und 10 ml-Säule Sephadex G-50 f und nach Sammlung des Eluats in je zehn Zweiminutenfraktionen wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen (Zeiss PMO II Spektralphotometer).

Für die 5 ml-Säule ergab die Messung einen Proteinpeak in der Verteilung von Elutionsbeginn bis einschließlich der 7. Minute, für die 10 ml-Säule von der (2.) 4. mit 12. Minute (Abb. 1).

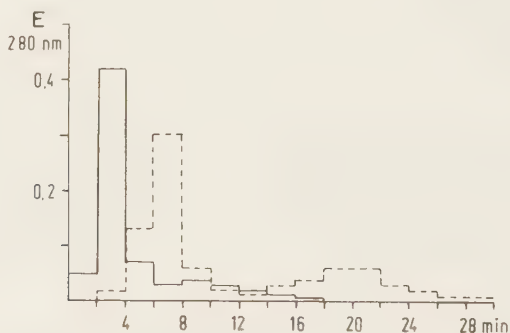


Abb. 1: Elution von Serumproteinen auf Sephadex G-50 f.
Ordinate: Extinktion bei 280 nm. Abszisse: Zeit in min.
Vergleich der Elution auf einer 5 ml- und 10 ml-Säule (gezogene und gestrichelte Linie) und Bestimmung des Ausschlußvolumens. Elution mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7.4.

2.2.2.

Bestimmung des inneren Volumens

Bei Elution mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer geht Natrium-¹²⁵Jodid als frei lösliches und dissoziiertes Salz vollständig in das innere Volumen sämtlicher Sephadexgele ein, deren Ausschlußgrenze bis zu einem Molgewicht von 700 bei G-10 herabreicht. Für die Salze Eisen-III-chlorid und Eisen-III-ammoniumsulfat mit einem für diese Zwecke vergleichbaren Molgewicht von 162 bzw. 208 ließ sich somit durch Filtration von Natrium-¹²⁵Jodid das innere Volumen verschiedener Dextrangele zunächst indirekt bestimmen.

Auf je einer 5 ml- und 10 ml-Säule Sephadex G-25 f und G-50 f wurde Natrium-¹²⁵Jodid mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer eluiert, die Eluate in Einminuten- oder Zweiminuten-Fractionen gesammelt und im Gamma-Zähler gemessen.

Die eingesetzte Aktivität fand sich mit 94% bis 101% nahezu quantitativ bei Verwendung von 5 ml-Säulen für Sephadex G-10 im Eluat der 12. mit 20. Minute, für Sephadex G-25 f und G-50 f im Eluat der 8. mit 16. Minute und bei Verwendung von 10 ml-Säulen für Sephadex G-25 f und G-50 f im Eluat der 16. mit 30. Minute (Abb. 2).

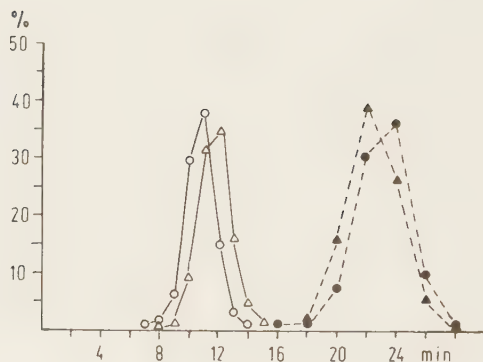


Abb. 2: Elution von Natrium-¹²⁵Jodid auf Sephadex G-25 f und G-50 f.

Ordinate: % der Gesamtaktivität.

Abszisse: Zeit in min.

Orientierende Bestimmung des inneren Volumens von Sephadex G-25 f (Kreise) und Sephadex G-50 f (Dreiecke) unter Verwendung von 5 ml- und 10 ml-Säulen (offene und geschlossene Symbole). Elution mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer.

3.

ERGEBNISSE

3.1. Filtration von wässriger ⁵⁹Eisen-III-chlorid-Lösung unter Verwendung verschiedener Dextrangele

Die zunächst orientierende Bestimmung des inneren Volumens durch Filtration von Natrium-¹²⁵Jodid ermöglichte die vergleichende Untersuchung von ⁵⁹Eisen-III-chlorid, wie sie im folgenden unter Verwendung von 5 ml-Säulen Sephadex G-10, G-15, G-25 f und sf, G-50 f und sf durchgeführt wurde. Dabei kamen auch verschiedene Puffersysteme zur Überprüfung, mit denen jeweils die Bereitung des Ansatzgemisches und die Elution von vier parallelen Säulen erfolgte.

3.1.1. Elution mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7.4

Einheitlich fand sich bei allen verwendeten Geltypen ein Einzelpeak, der über acht bis zehn Minuten verteilt war und 55% bis 96% der Gesamtaktivität betrug. Unterschiedlich war die Lokalisation dieses Peaks, der bei Sephadex G-10 und G-15 den Fraktionen der 3. mit 12. Minute, bei Sephadex G-25 f der 5. mit 14. Minute und bei Sephadex G-50 f der 7. mit 14. Minute zugehörte (Abb.3a). Höhe und Lokalisation dieses Peaks machten diesen Puffer unbrauchbar.

3.1.2. Elution mit 0.05 mol/l Veronalpuffer pH 7.4

Die Elution mit Veronalpuffer (Abb. 3b) führte bei sämtlichen Geltypen in Form eines breiten, zum Teil zweigipfeligen Peaks zu einer Aktivitätsverteilung auf die Fraktionen der 3. mit 16. Minute, die lediglich zwischen 2% und 7% der Gesamtaktivität ausmachte. Wegen der ungenügenden Trennung zwischen äußerem und innerem Volumen war dieser Puffer jedoch ebenfalls nicht praktikabel.

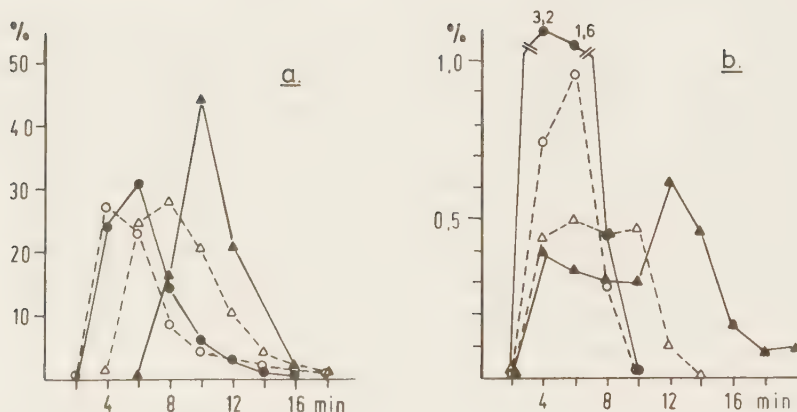


Abb. 3a und 3b: Elution von ^{59}Fe -III-chlorid mit 0.05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7.4 (a) und 0.05 mol/l Veronalpuffer pH 7.4 (b). Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min. Vergleich von Sephadex G-10 und G-15 (offene und geschlossene Kreise), sowie G-25 f und G-50 f (offene und geschlossene Dreiecke) auf 5 ml-Säulen.

3.1.3. Elution mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 und pH 8.0

Wie bei Elution mit Phosphatpuffer war bei Verwendung der Tris-HCl-Puffer pH 7.4 und pH 8.0 (Abb. 4a und 4b) jeweils ein Einzelpeak abgrenzbar, aber mit nur 1% bis 5% der Gesamtaktivität. Auch die Lokalisation des Peaks ergab entsprechend dem Vernetzungsgrad der Geltypen wiederum eine Art Umverteilung vom äußeren Volumen bei Sephadex G-10 und G-15 in das innere Volumen bei Sephadex G-25 f, vermehrt noch bei Sephadex G-50 f entsprechend den Fraktionen der 7./8. mit 16. Minute.

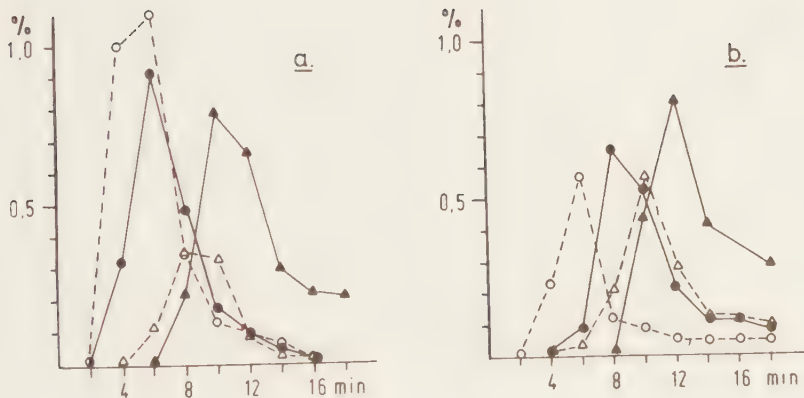


Abb. 4a und 4b: Elution von ⁵⁹Eisen-III-chlorid mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 (a) und pH 8.0 (b).
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleich von Sephadex G-10 und G-15 (offene und geschlossene Kreise), sowie G-25 f und G-50 f (offene und geschlossene Dreiecke) auf 5 ml-Säulen.

Die vergleichende Filtration über Sephadex G-25 sf und G-50 sf ließ kein unterschiedliches Verhalten des ⁵⁹Eisen-III-chlorid gegenüber den Präparaten mit größeren Partikeln erkennen (Abb. 5a und 5b).

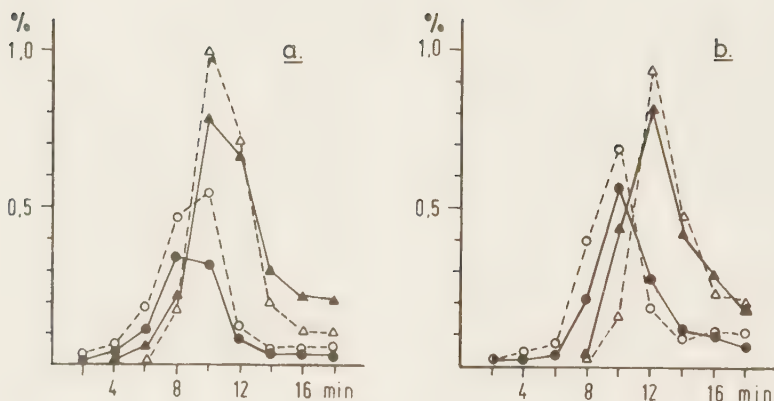


Abb. 5a und 5b: Elution von ^{59}Fe -III-chlorid auf Sephadex G-25 / 50 f und G-25 / 50 sf. Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min. Vergleich unterschiedlicher Gelpartikelgrößen "fine" (geschlossene Symbole) und "superfine" (offene Symbole) bei Sephadex G-25 (Kreise) und G-50 (Dreiecke). Verwendung von 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 (a) und pH 8.0 (b) und 5 ml-Säulen.

Gegenüber der Verwendung von 5 ml-Säulen Sephadex G-25 f bzw. G-50 f bewirkte eine Verdoppelung des Gelvolumens in 10 ml-Säulen ein verzögertes Auftreten des Peaks in den Fraktionen der (10.) 12. mit 18. Minute sowie der 16. mit 28. Minute. Der Vergleich ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die Ausbeute bei diesen Versuchen entsprach jeweils quantitativ der eingesetzten Aktivität. Dies wird in Kapitel 3.2.2. und 3.2.3. gesondert dargelegt.

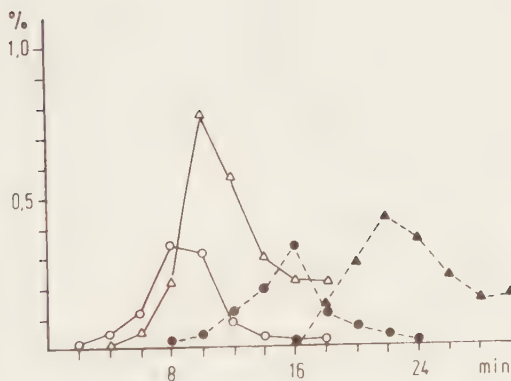


Abb. 6: Filtration von ^{59}Fe -III-chlorid auf 5 ml- und 10 ml-Säulen.
Ordinate: % der Gesamtaktivität.
Abszisse: Zeit in min.
Vergleichende Filtration auf einer 5 ml- und 10 ml-Säule (offene und geschlossene Symbole) Sephadex G-25 f und G-50 f (Kreise und Dreiecke) mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer.

3.1.4. Rechromatographie

Grundsätzlich auffallend erschien, daß eine ^{59}Fe -III-chloridlösung bei Filtration kein einheitliches Verhalten aufwies, sondern konstant eine Fraktionierung zustande kommen konnte. Die beträchtliche Variabilität dieser Fraktionierung bei Anwendung verschiedener Puffer machte eine Verunreinigung der Eisenchargen eher unwahrscheinlich, aber letztlich nicht unmöglich, wie auch anderweitig vermutet (9). Durch Rechromatographie sollte diese Ursache ausgeschlossen werden.

Hierzu wurden nach Erstelution mit Tris-HCl-Puffer pH 7.4 auf einer 5 ml-Sephadex G-50 f Säule die Einzelfractionen des inneren Volumens von insgesamt 5.9 ml und 9% der Gesamtaktivität verwendet. Eine Einengung dieses Eluats über konzentrierte Schwefelsäure ermöglichte vergleichbare Ansatzbedingungen bezüglich des Probenvolumens für die Rechromatographie, die ein identisches Elutionsdiagramm mit einem Einzelpeak von 8% der eingesetzten und aus der Erstelution gewonnenen Aktivität ergab (Abb. 7).

3.1.5. Chargenvergleich

Bei Verwendung der aufgeführten ⁵⁹Eisen-III-chlorid-Chargen resultierten Ergebnisse mit völlig unterschiedlichen Fractionen für das innere Volumen. Dies wird verständlich durch die teils großen Differenzen der spezifischen Aktivität von Charge zu Charge.

Die vergleichende Elution zweier solcher Chargen 1 (spezifische Aktivität 20.4 mCi/mg) und 2 (spezifische Aktivität 46.2 mCi/mg) erfolgte bei üblichem Ansatz mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer auf zwei 5 ml-Säulen Sephadex G-50 f. Dabei wurden von Charge 1 100 µl mit 45276 cpm, von Charge 2 100 µl mit 104928 cpm eingesetzt und in der Fraction des inneren Volumens als Peak gleicher Lokalisation für Charge 1 3% und für Charge 2 7% der Gesamtaktivität gefunden (Abb. 8). Dies heißt, daß der prozentuale Anteil der eingesetzten Radioaktivität, der im inneren Volumen eluiert wird, von der Menge kalten Eisens abhängt und entsprechend der spezifischen Aktivität differiert. Im vorliegenden Beispiel konnte für das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten wie auch der beiden Peaks zu einander je ein Quotient von 0.43 errechnet werden.

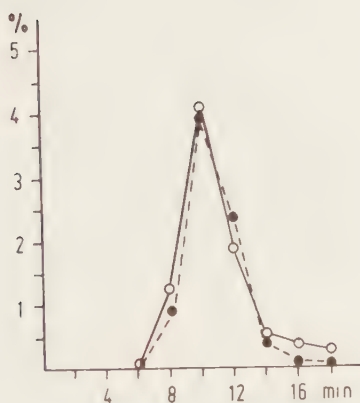


Abbildung 7

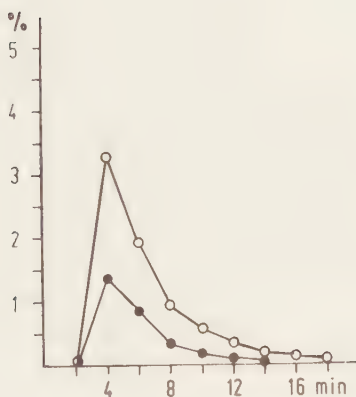


Abbildung 8

Abb. 7: Rechromatographie von 59 Eisen-III-chlorid.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Erstelution (Kreise offen) von $^{59}\text{FeCl}_3$ und
 Rechromatographie nach Einengung der Fraktion
 des inneren Volumens (Kreise geschlossen) unter
 Verwendung von 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4
 auf einer Sephadex G-50 f - 5 ml-Säule.

Abb. 8: Elutionsdiagramme verschiedener 59 Eisen-III-chlorid-Chargen.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleich zweier $^{59}\text{FeCl}_3$ -Chargen unterschiedlicher
 spezifischer Aktivität: Charge 1 (Kreise offen) und
 Charge 2 (Kreise geschlossen). Elution mit 0.05 mol/l
 Tris-HCl-Puffer auf 5 ml-Säulen Sephadex G-15.

3.2. Elution von Serum nach Inkubation mit $^{59}\text{Eisen-III.}$

3.2.1. Zur Ansatzberechnung

Zwei Mischseren kamen zur Anwendung, für die durch einfache Serumverdünnung (s. 3.2.5.) eine UEBK von 250 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Serum 1) und 200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Serum 2) ermittelt worden war. Jedem Ansatzgemisch wurden 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ entsprechend 0.095 μg Eisen-III zugegeben. Mit Serum 1 sollte durch einen reichlichen Überschuß von 50 μl (entspricht 0.125 μg UEBK) eine vollständige Proteinbindung des markierten Eisen-III erzielt werden, durch Einsatz von 20 μl (entspricht 0.05 μg UEBK) eine Bindung von ca. 50%. Für die Serumverdünnungsreihe wurde Serum 2 genommen und der Ausgangswert mit 50 μl (entspricht 0.1 μg UEBK) unverdünnt bei ca. 105% errechneter Proteinbindung eingestellt.

3.2.2. Untersuchung verschiedener Geltypen

Zunächst bestand die Frage nach dem Ausmaß der Bindungsfähigkeit eines Mischserums gegenüber Eisen in Form des $^{59}\text{Eisen-III-chlorids}$, gegebenenfalls auch in Abhängigkeit von dem zur Chromatographie verwendeten Gel.

Es wurde über 5 ml-Säulen von Sephadex G-15, G-25 f und G-50 f mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer eluiert. Das übliche Ansatzvolumen von 0.5 ml enthielt einen Serumüberschuß entsprechend der oben vorangestellten Berechnung.

Die eingesetzte Aktivität war nahezu quantitativ und ohne Unterschied für die einzelnen Geltypen in den Fraktionen der (0.) 2. mit 8. Minute nachweisbar : 109% der Gesamtaktivität bei Verwendung von Sephadex G-15, 108% bei G-25 f und 102% bei G-50 f. Die Nachelution mit 0.02 mol/l Salzsäure über 30 Minuten erbrachte Restaktivitäten unter bzw. um 1% für Sephadex G-15, G-25 f und G-50 f, so daß der serumgebundene Anteil der Gesamtausbeute entsprach.

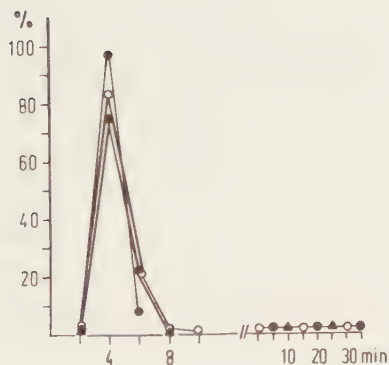


Abb. 9: Elution von ^{59}Fe -III-chlorid und Inkubation mit Serum im Überschuß.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Auftrag der Elution mit Puffer in Zweiminuten-, der Nachelution mit Säure in Fünfminuten-Fractionen bei Vergleich von Sephadex G-15 und G-25 f (Kreise offen und geschlossen), sowie G-50 f (Dreiecke). Verwendung von 5 ml-Säulen und 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 und 0.02 mol/l HCl.

3.2.3. Säureelution und Ausbeute

Die serumgebundene ^{59}Fe -III-Fraktion ist nach dem vorherigen Versuch erwartungsgemäß dem äußeren Volumen zugehörig. Die Zuordnung der ungebundenen, freien Fraktion zeigte die Elution von Natrium- $^{125}\text{Jodid}$ wie auch von reinem Eisen-III-chlorid: ein zum Teil geringer Anteil erscheint im inneren Volumen, der Hauptteil verbleibt bei Fortsetzung der Elution mit Tris-HCl-Puffer im physiologischen Milieu auf der Säule. Die Darstellung dieser drei Fraktionen sollte durch Filtration eines ^{59}Fe -III-chlorid / Proteingemisches entsprechend einem gebundenen Anteil von ca. 50% erreicht werden.

Bei gleichzeitiger Verwendung von vier 5 ml-Säulen Sephadex G-50 f wurde die Elution mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 wie üblich zur Gewinnung des äußeren und inneren Volumens auf 20 Minuten ausgedehnt, die Nachelution auf den vier Säulen über 30 - 40 - 60 - 80 Minuten mit 0.02 mol/l Salzsäure durchgeführt, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß hiermit das Sephadex-gebundene Eisen vollständig eluiert wird.

Der gebundene ^{59}Fe -Eisen-III-Anteil betrug im äußeren Volumen einschließlich der Acht- (bis Zehn-) Minuten-Fraktion auf den vier verwendeten Säulen zwischen 49% und 52% (Abb. 10).

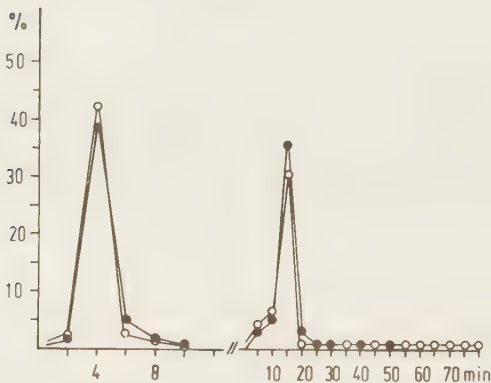


Abb. 10: Serumgebundener und freier Anteil des ^{59}Fe -Eisen-III-chlorid.

Ordinate: % der Gesamtaktivität.

Abszisse: Zeit in min.

Elution mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in

Zweiminuten-, Nachelution mit 0.02 mol/l HCl in

Fünfinuten-Fraktionen über 30 bzw. 40 min, sowie

60 bzw. 80 min (offene sowie geschlossene Kreise).

Verwendung von 5 ml-Säulen Sephadex G-50 f.

Die dem inneren Volumen zugehörigen Fraktionen von der 8. (10.) Minute mit 16. Minute zeigten kaum nennenswerte Aktivitäten bedingt durch einen Überhang des Proteinpeaks : 3% - 6% - 4% - 1%. Bei Nachelution und Sammlung in Fünfminuten-Fraktionen fand sich das Maximum der Restaktivität (Sephadex-gebundenes Eisen) innerhalb der ersten 20 Minuten, die 20. bis 30. Minute ergab noch einen Aktivitätszuwachs von ca. 1%, der darüber hinaus bis zur 80. Minute unter 1% der Gesamtaktivität blieb.

Die Gesamtausbeute errechnete sich demnach aus den Fraktionen der Puffer- und Säureelution für Säule I mit 103% (55% gebundener, 48% freier Anteil), für Säule II mit 101% (55%, 46%), für Säule III mit 101% (55%, 46%), und für Säule IV mit 97% (51%, 46%).

Vergleichbare Verhältnisse fanden sich auch bei Verwendung einer 10 ml-Säule, wobei in Abbildung 11 lediglich das Diagramm der Pufferelution dargestellt ist. Im Vergleich zu einer 5 ml-Säule zeigt sich jedoch, daß der Peak im äußeren Volumen einer 10 ml-Säule bereits mit der 12. bis 14. Minute abgeschlossen und somit gegenüber dem inneren Volumen mit Beginn der 16. Minute ausreichend abgesetzt ist.

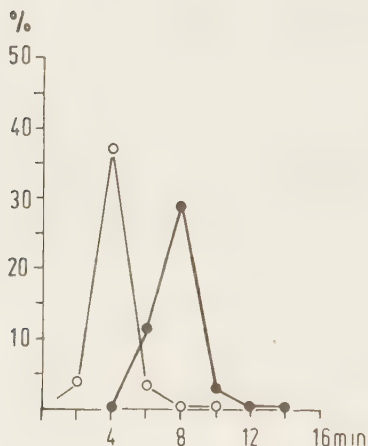


Abbildung 11

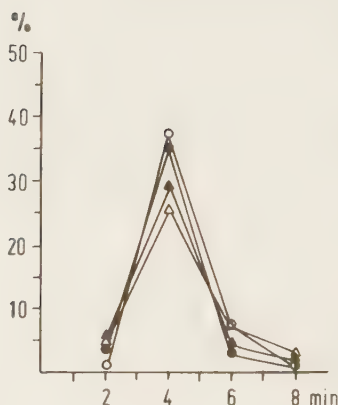


Abbildung 12

Abb. 11: Elution eines Inkubationsgemisches von Serum-⁵⁹Eisen-III-chlorid auf 5 ml- und 10 ml-Säulen.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleichende Elution auf einer 5 ml- und 10 ml-Säule (offene und geschlossene Symbole) Sephadex G-50 f mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer.

Abb. 12: Serumbindung und pH.
 Ordinate : % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleichende Elution von ⁵⁹FeCl₃ auf 5 ml-Säulen Sephadex G-50 f mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer bei pH 7.2 und pH 7.6 (Kreise offen und geschlossen), sowie bei pH 8.0 und pH 8.4 (Dreiecke offen und geschlossen).

3.2.4. Proteinbindung und Inkubationsbedingungen

Nach (1) ist im physiologischen Milieu bei pH 7.4 die Bindung zwischen Transferrin und Eisen mit einer Affinitätskonstante von 10^{30} am stärksten. Diese Eigenschaft des Transferrins bestimmte von vornherein die Wahl des pH-Bereichs der verwendeten Puffersysteme. Deswegen wurde die Bindungsfähigkeit des Serums nur orientierend bei stufenweiser pH-Änderung entsprechend pH 7.2 - 7.6 - 8.0 - 8.4 unter Verwendung von Tris-HCl-Puffer überprüft. Der Versuchsansatz war wiederum auf einen gebundenen Anteil von ca. 50% abgestimmt.

Bei pH 8.0 und 8.4 lag die Proteinbindung des $^{59}\text{Eisen-III}$ mit 42 bzw. 43% deutlich niedriger als bei pH 7.2 und 7.6, erschien jedoch konstant (Abb.12). Dagegen zeigte die Bindung bei pH 7.2 und 7.6 eine geringgradige Abnahme von 50 auf 47% der Gesamtaktivität, was, wie auch mit anderen Versuchen in diesem niedrigeren pH-Bereich belegt, einen zu vernachlässigenden Effekt darstellte. So wurde prinzipiell mit Pufferlösungen von pH 7.4 gearbeitet. Eine Inkubation des Serums zwischen 5 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur hatte auf die Proteinbindung von $^{59}\text{Eisen-III}$ keinen Einfluß, was mit COOK (9) übereinstimmt.

3.2.5. Serumverdünnung und Elution auf Sephadex G-50 f

Die Filtration von $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ ohne und mit Zusatz von Serumproteinen verlief insofern völlig unterschiedlich, als mit zunehmender Bindung des Eisens an sein Trägerprotein in einem Bereich zwischen 50% bis 100% in der Fraktion des inneren Volumens keine Aktivität mehr auffindbar war. Eine möglicherweise konkurrierende Bindung des Eisens an Serumproteine oder Dextrangel sollte sich durch die abnehmenden Proteinkonzentrationen in einer Serumverdünnungsreihe zeigen lassen.

Das Ansatzgemisch mit unverdünntem Serumanteil war auf eine Proteinbindung von ca. 100% eingestellt, die Verdünnung 1:2, 1:4, 1:8 wurde mit dem zur Elution benutzten Tris-Puffer hergestellt.

Aus Abbildung 13 wird erkennbar, daß neben dem proteingebundenen Anteil des $^{59}\text{FeCl}_3$ ab der 6. Minute und ab einer Serumverdünnung von 1:2 rein zeichnerisch ein der Fraktion des inneren Volumens zugehöriger Peak auftaucht. Dieser Peak nimmt

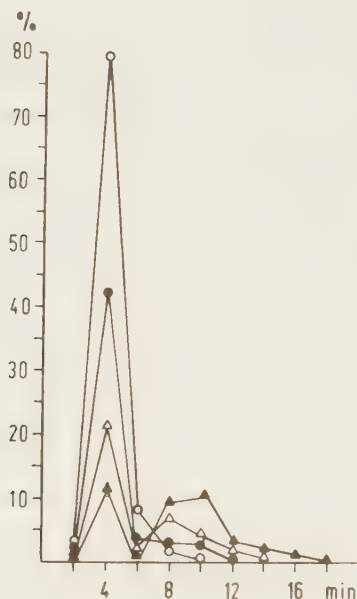


Abb. 13: Elution von $^{59}\text{FeCl}_3$ auf Sephadex G-50 f nach Inkubation mit Serum in einfacher Verdünnung. Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min. Darstellung der Elutionsdiagramme bei Zusatz von unverdünntem Serum bzw. in der Verdünnung 1:2 (Kreise offen und geschlossen), sowie in der Verdünnung 1:4 und 1:8 (Dreiecke offen und geschlossen). Spülung mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 auf 5 ml-Säulen.

mit abnehmender Serumkonzentration prozentual zu und wird damit besser abgrenzbar. Zur Verdeutlichung dieses Verhaltens wurde in Abbildung 14 das innere Volumen gegenüber dem proteingebundenen Anteil jeweils in Prozent der Gesamtaktivität aufgetragen. Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, lassen sich die Fraktionen des äußeren und inneren Volumens knapp zum Zeitpunkt der 6. Minute trennen. Dabei sind in der Fraktion des äußeren Volumens im Serum 90% - 48% - 26% - 16% der Gesamtaktivität entsprechend der einfachen Serumverdünnungsreihe bis 1:8 gebunden. Die fortlaufende additive Darstellung der Einzelaktionen von der 2. bis zur 18. Minute in Abbildung 15 zeigt die ungenügende Trennschärfe, da unmittelbar nach der 6. Minute die Fraktion des inneren Volumens miteingeht.

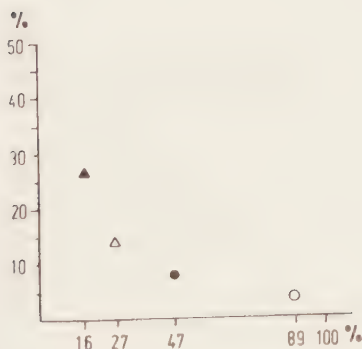


Abbildung 14

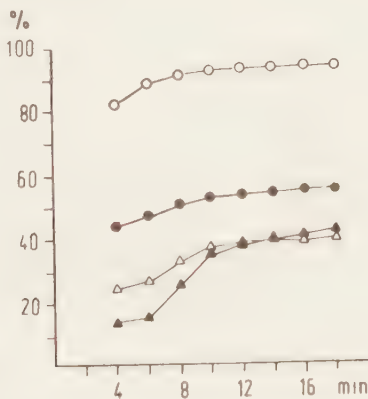


Abbildung 15

Abb. 14: Beziehung zwischen serumgebundener und freier, nicht Sephadex-gebundener $^{59}\text{Fe-III}$ -Fraktion.
Ordinate: Freies $^{59}\text{Fe-III}$. Abszisse: Gebundenes $^{59}\text{Fe-III}$, jeweils in % der Gesamtaktivität.
Übertragen sind die Gesamtfaktionen des äußeren und inneren Volumens aus Abb. 13.

Abb. 15: Additive Darstellung der Elutionsdiagramme aus Abb. 13.
Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min.
Fortlaufender Auftrag mit Addition der Einzelfaktionen aus Abb. 13.

3.2.6. Serumverdünnung und Elution auf Sephadex G-15

Vergleichbar zu der im inneren Volumen einer Sephadex G-50 Säule eluierbaren freien Eisenfraktion stellte sich bei Filtration über Sephadex G-15 eine Fraktion nur im äußeren Volumen dar (Abb. 4a). Ob bzw. wie ausgedehnt diese ungebundene Eisenfraktion bei Verwendung von Sephadex G-15 in die Bestimmung des proteingebundenen Anteils eingehen könnte, wurde wiederum mit einfacher Serumverdünnung bis 1:8 und identischen Ansätzen wie im vorhergehenden Versuch geprüft. Die Ergebnisse der Elution sind in den Abbildungen 16 und 17 aufgetragen.

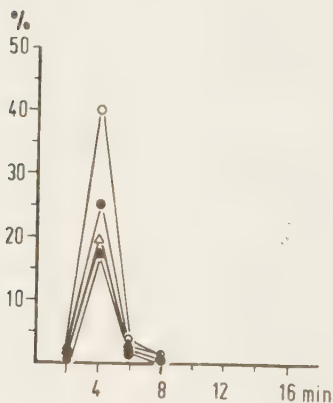


Abbildung 16

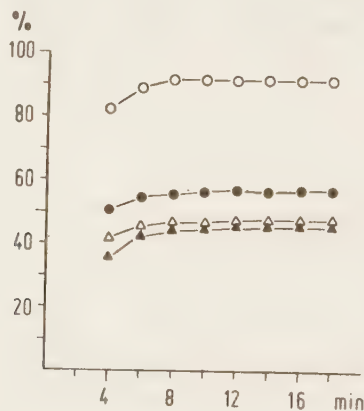


Abbildung 17

Abb. 16: Elution von ⁵⁹Eisen-III-chlorid auf Sephadex G-15 nach Inkubation mit Serum in einfacher Verdünnung. Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min. Elutionsdiagramme nach Inkubation mit unverdünntem Serum bzw. in der Verdünnung von 1:2 (Kreise offen und geschlossen), sowie in der Verdünnung von 1:4 und 1:8 (Dreiecke offen und geschlossen). Spülung mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 auf 5 ml-Säulen.

Abb. 17: Additive Darstellung der Elutionsdiagramme aus Abb. 16. Ordinate: % der Gesamtaktivität. Abszisse: Zeit in min. Fortlaufender Auftrag mit Addition der Einzelfraktionen aus Abb. 16.

Erwartungsgemäß war im Bereich des inneren Volumens kein Peak nachweisbar. Bei fortlaufend additiver Darstellung der Zweiminuten-Fractionen war das Aktivitätsmaximum der protein- gebundenen Fraktion nach 8 Minuten mit Abschluß des äußeren Volumens erreicht und betrug 91% - 56% - 47% - 46% der Gesamt- aktivität in der Reihenfolge der einfachen Serumverdünnung bis 1:8.

3.2.7. Inkubation von Serum mit markiertem und nichtmarkiertem Eisen-III.

Zur Ansatzberechnung:

Wieder wurden Serum 1 mit einer UEBK von 250 µg/100 ml und Serum 2 mit einer UEBK von 200 µg/100 ml verwendet. Je Probe wurden 150 µl ⁵⁹Eisen-III-chlorid entsprechend 0.095 µg Eisen-III eingesetzt.

Zu Versuch 1:

Der Einsatz von 50 µl Serum 2 (entspricht 0.1 µg UEBK) war auf eine vollständige Proteinbindung von ca. 100% ausgelegt, der Einsatz von 20 µl Serum 2 (entspricht 0.04 µg UEBK) auf eine Bindung von ca. 40%, der Zusatz von 10 µl nichtmarkiertem Eisen-III-ammoniumsulfat (entspricht 0.125 µg Eisen-III) auf eine möglichst völlige Verdrängung des ⁵⁹Eisen-III aus seiner Proteinbindung.

Zu Versuch 2:

Für Serum 1 errechnete sich bei Einsatz von 20 µl (entspricht 0.05 µg UEBK) gegenüber 150 µl ⁵⁹Eisen-III-chlorid ein gebundener Anteil von ca. 50%, für den Zusatz von 10 µl nicht- markiertem Eisen-III-ammoniumsulfat in der Verdünnung 1:8 eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Ansatz um ca. 30%, für die Aufteilung des nichtmarkierten Eisens auf die Fractionen des äußeren und inneren Volumens eine Reduktion des gebundenen Anteils von 50% um 15% (auf 35%).

Neben der Absicht, die Proteinbindung des $^{59}\text{Eisen-III}$ durch Zusatz von nichtmarkiertem Eisen-III zu verändern, interessierte im folgenden besonders der Einfluß auf die freie $^{59}\text{Eisenfraktion}$. Zur Darstellung dieses ungebundenen Anteils in der Fraktion des inneren Volumens wurden über Sephadex G-50 f, wie üblich mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer, zweimal je vier Vergleichsansätze eluiert.

Versuch 1: Aufgefüllt auf das übliche Ansatzvolumen von 0.5 ml wurden auf Säule I 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ und 50 μl Serum 2 im Überschuß aufgetragen, auf Säule II 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ und 20 ml Serum, auf Säule III 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ und 10 μl Eisen-III-ammoniumsulfat und 50 μl Serum 2.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, bestätigten sich auf den Säulen I und II ohne Zusatz von nichtmarkiertem Eisen die bisherigen Beobachtungen. Bei geringerem Serumanteil, entsprechend 44% proteingebundenem $^{59}\text{Eisen}$ auf Säule II, ist die freie Fraktion bereits als Peak von 9% der Gesamtaktivität im inneren Volumen abzugrenzen. Ein Serumüberschuß wie auf Säule I bindet dagegen mit 96% quantitativ die eingesetzte Aktivität im äußeren Volumen. Der Zusatz von nichtmarkiertem Eisen-III im Überschuß auf Säule III reduziert die Fraktion des äußeren Volumens auf ca. 10% und bringt gleichzeitig wieder einen Peak im inneren Volumen zum Vorschein, der 32% der Gesamtaktivität ausmacht. Bei alleiniger Filtration von $^{59}\text{Eisen-III-chlorid-Lösung}$ auf Säule IV betrug im Vergleich die Fraktion des inneren Volumens 36%.

Versuch 2: Für den folgenden Vergleich wurde von Versuch 1 der Ansatz für Säule I mit 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ und 20 μl Serum 1 unverändert übernommen und für Säule II 10 μl nichtmarkiertes Eisen-III-ammoniumsulfat in der Verdünnung 1:8 zugesetzt. Der Ansatz für Säule III enthielt 150 μl $^{59}\text{Eisen-III-chlorid}$ und 10 μl nichtmarkiertes Eisen-III in der Verdünnung 1:8. Die isolierte Filtration von 150 μl $^{59}\text{Eisen}$ auf Säule IV diente wieder als Referenz.

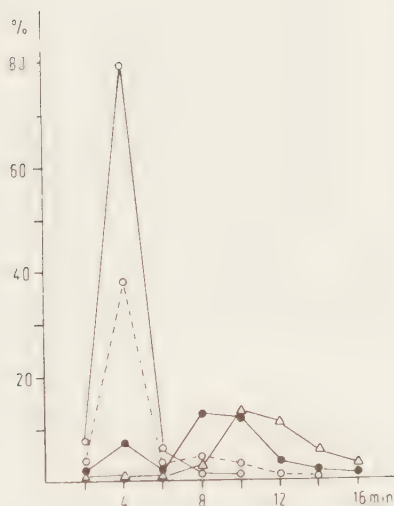


Abb. 18: Elution von Serum nach Inkubation mit markiertem und nichtmarkiertem Eisen-III.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleich der Säulen I - IV (siehe 3.2.7. - Versuch 1).
 S I und S II (offene Kreise, gezogene und gestrichelte Linie) : Serumbindung des ^{59}Fe -III von 96% bzw. 44%;
 S III (geschlossene Kreise) : Verdrängung des Eisen-III;
 S IV (offene Dreiecke) : Filtration von ^{59}Fe -III ohne Serum.

Durch Zusatz von $0.031 \mu\text{g}$ Eisen-III-ammoniumsulfat ging die Proteinbindung des ^{59}Fe -III von 51% in Säule I auf 36% in Säule II zurück, was einer Freisetzung von $0.014 \mu\text{g}$ ^{59}Fe Eisen gleichkommt. Gleichzeitig nahm die meßbare freie Eisenfraktion von 6% auf 10% in Säule II zu. Diese freie Fraktion blieb mit 34% und 36% der Gesamtaktivität unverändert, wenn ^{59}Fe -III auf Säule III mit oder auf Säule IV ohne Zusatz von Eisen-III-ammoniumsulfat filtriert wurde (Abb. 19).

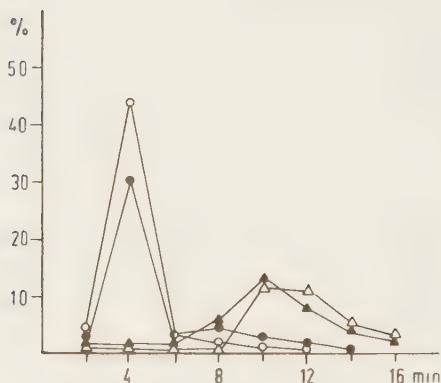


Abb. 19: Elution von Serum nach Inkubation mit markiertem und nichtmarkiertem Eisen-III.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Vergleich der Säulen I - IV (siehe 3.2.7. - Versuch 2).
 S I und S II (offene und geschlossene Kreise) : Serum-
 bindung von 51% und Verdrängung des 59 Eisen-III;
 S III und S IV (geschlossene und offene Dreiecke) :
 Filtration von 59 Eisen-III mit und ohne Zusatz von
 Eisen-III-ammoniumsulfat.

Zusammengefaßt sind diese Ergebnisse in Abbildung 20. Wenn unter Verwendung von Sephadex G-50 f 59 Eisen-III allein oder unter Zusatz von nichtmarkiertem Eisen-III eluiert oder durch einen Überschuß nichtmarkierten Eisens ganz aus seiner Proteinbindung verdrängt wird, dann ist jeweils eine vergleichbare Fraktion freien 59 Eisen-III im inneren Volumen nachweisbar.

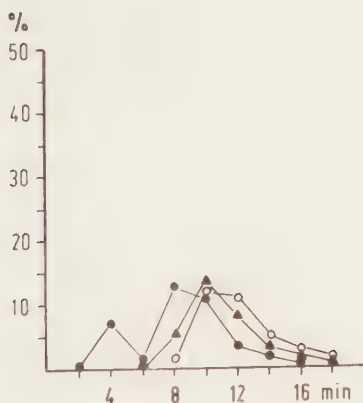


Abb. 20: Vergleichende Darstellung der freien, nicht Sephadex-gebundenen Eisenfraktion.
 Ordinate: % der Gesamtaktivität.
 Abszisse: Zeit in min.
 Nach Abb. 18 (geschlossene Kreise) : Inkubation des Serums mit nichtmarkiertem Eisen-III im Überschuß.
 Nach Abb. 19 (Dreiecke und offene Kreise) : Filtration von ⁵⁹Eisen-III mit und ohne Zusatz von nichtmarkiertem Eisen-III.

4.

DISKUSSION

Um das Prinzip der Säulenchromatographie zur Bestimmung der Eisenbindungskapazität (EBK) verwenden zu können, wurden in einer Reihe von Einzelversuchen die entsprechenden Vorbedingungen untersucht. Die Säulenchromatographie sollte eine Automatisierung der Bestimmung ermöglichen, wie sie in unserer Klinik nach HORN et al. (32) zur routinemäßigen Hormonbestimmung schon lange eingeführt ist.

Unter den Methoden zur Bestimmung der EBK wurde die Isotopentechnik (4, 5, 6, 9, 10, 20, 23, 24, 36, 40, 51, 55) ausgewählt, da sie die direkte Messung der ungesättigten und totalen Eisenbindungskapazität (UEBK und TEBK) erlaubt. Es erübrigt sich die zusätzliche Bestimmung des zur Bindung zugesetzten Eisens mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens oder der Atomabsorptionsspektroskopie mit den jeweils zugehörigen methodischen Schwierigkeiten. Für die Photometrie sind dies neben der relativ geringen Empfindlichkeit der Methode die unspezifische Hintergrundabsorption (30, 47) und wie für die Atomabsorptionsspektroskopie (28, 46, 47, 51, 58, 60, 62, 63) der störende Einfluß der Hämolyse (8, 10, 20, 21, 36, 48, 54, 59). Die Atomabsorptionsspektroskopie erfordert zusätzlich einen beträchtlichen apparativen Aufwand und insbesondere die Arbeit mit biologischem Material wird durch physikalische und chemische Interferenzen erschwert (51, 56, 60, 63).

Bei der herkömmlichen klinischen Methode, das Transferrin über die Eisenbindungskapazität des Serums nach dessen Absättigung mit Eisen zu erfassen, wird in der Regel das ungebundene, freie Eisen durch Adsorption von der proteingebundenen Fraktion abgetrennt. Die Ergebnisse dieser Methode werden durch die Eigenschaften und die jeweilige Verwendungsart der Adsorbentien mitbestimmt. So können Anionenaustauscherharze als Puder (54), als Streifen (23, 24) oder in Form von Säulen (40) verwendet werden und je nach dem Ausmaß ihrer Hydrierung (40) unterschiedlich adsorbieren. Neben einer zu schwachen kann auch

eine zu starke Adsorption störend wirken und Eisen gegebenenfalls wieder aus seiner Proteinbindung lösen. Diese Möglichkeit besteht grundsätzlich für Anionenaustauscher, Magnesiumkarbonat wie auch aktivierte Holzkohle (9, 10, 20, 21, 36, 40). Im Vergleich stellt sich eine Trennung der beiden Fraktionen durch Ultrafiltration eindrucksvoll einfach dar (40). Bei Verwendung von Dextrangelen, die auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften als biologisch weitgehend inert gelten (49, 50), war ein ähnliches Verhalten immerhin vorstellbar.

Diese Erwartung ließ sich insofern nicht bestätigen, als die Filtration von zunächst wässriger ⁵⁹Eisen-III-chloridlösung zu einer Verteilung der Aktivität führte, die sich nicht allein im Eluat, sondern vornehmlich als Sephadex-gebundener Anteil wiederfand. Entsprechend der gewählten Versuchsanordnung wurde dabei mit 0.05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.4 über 5 ml-Säulen der verschiedenen Sephadexgele G-10, G-15, G-25 f (sf) und G-50 f (sf) mit 0.42 ml/min eluiert. Die Bindung des freien Eisens an Sephadex genügte nicht zur vollständigen Abtrennung gegenüber dem proteingebundenen Anteil, zumindest nicht bei Verwendung eines Säulenvolumens bis zu 10 ml und einer Elutionsgeschwindigkeit zwischen 0.23 ml und 0.42 ml/min. So wurde für die Geltypen Sephadex G-25 f und G-50 f ohne Serum der frei eluierbare Eisenanteil gegenüber dem Sephadex-gebundenen in Abhängigkeit von der jeweiligen spezifischen Aktivität des markierten Eisens (Abb. 18 und 19) mit bis zu 38% der Gesamtaktivität bestimmt. Quantitativ gilt dies auch für die Gelsorten Sephadex G-10 und G-15. Der Versuch, mit Sephadex eine Trennung doch nach der herkömmlichen Art durch Adsorption zu erreichen, war somit undurchführbar.

Konnte über Sephadex G-25 f und G-50 f die freie Eisenfraktion, soweit nicht Sephadex-gebunden, über das innere Volumen des Gelbettes eluiert werden, war dies bei vergleichender Elution über Sephadex G-10 und G-15 nicht möglich. Die Filtration fand hier überwiegend im Ausschlußvolumen statt (Abb. 4).

Dieses Verhalten wurde als Folge einer Komplexbildung des Eisens angesehen, wie dies in gleicher Weise von NIELSEN (45) gedeutet worden ist. Zu dieser Auffassung berechtigt die Eigenschaft des Eisens, in wässriger Lösung bei pH-Werten über 2 zunehmend über Hydroxyde Komplexe zu bilden (42). Die Voraussetzung hierfür ist durch die Versuchsbedingung gegeben, da zur Transferrinsättigung ein physiologischer pH-Bereich erforderlich ist. Entscheidender Einfluß scheint dabei auch den einzelnen Puffersystemen zuzukommen, denn im Gegensatz zu Tris-HCl blieb bei Elution mit Phosphat- und Veronalpuffer das filtrierte Eisen auch bei Gelen niedrigeren Vernetzungsgrades wie Sephadex G-25 und G-50 vom inneren Gelbett ausgeschlossen (Abb. 3).

Die Elution von Serum nach Absättigung mit Eisen bestätigte diese Beobachtungen, die zunächst bei alleiniger Filtration einer wässrigen Eigenlösung gemacht werden konnten. So erschienen erwartungsgemäß bei Elution von Serum mit Tris-HCl-Puffer über Sephadex G-10 und G-15 und zum Teil auch G-25 die proteingebundene und freie, nicht Sephadex-gebundene Eisenfraktion gemeinsam im Ausschlußvolumen. BARBER, DEMPSTER und ANDERSON (4) erzielten, allerdings bei Elution mit Triscitrat-Puffer, eine Fraktionierung erst bei Verwendung des niedriger vernetzten Sephadex G-50 und bei Vergrößerung der Säule auf das vierzig- bis fünfzigfache des eingesetzten Probenvolumens. Daraus wird deutlich, daß das Anion Citrat selbst ein starker Komplexbildner ist (42). Die hochgradige Probenverdünnung war nur im Rahmen der angewandten Tracermethode noch tolerabel. NIELSEN (45) hingegen hatte keine Schwierigkeiten, mit Triscitrat eine ausreichende Trennung über Sephadex G-25 Säulen des 10fachen Probenvolumens durchzuführen. Es ist anzunehmen, daß dies wiederum Folge der andersgearteten Komplexbildung nach Zusatz des Chromogens o-Phenanthrolin ist.

Bei Elution mit Tris-HCl ermöglichte, wie aus Abbildung 13 zu ersehen, Sephadex G-50 f eine Auftrennung der beiden Fraktionen in zwei Peaks, die verteilt auf äußeres und inneres Volumen

Über ein bis zwei Minuten abgrenzbar wurden. Diese letztlich unzureichende Fraktionierung bei Beschränkung auf das Gelvolumen einer 5 ml-Säule verdeutlicht Abbildung 15; die additive Darstellung der in Einzelfractionen gesammelten Aktivität zeigt den Verlust der Trennschärfe bereits zum Zeitpunkt der 7./8. Minute mit Beginn des inneren Volumens. Die Verhältnisse stellen sich bei Verdoppelung des Gelvolumens auf 10 ml und annähernd auch der Säulenhöhe unter gleichbleibender Elutionsgeschwindigkeit deutlich günstiger dar (Abb. 11). Die Gesamtdauer der Elution verdoppelt sich ohne Berücksichtigung des Sephadex-gebundenen Eisens auf etwa 32 Minuten.

Unter den Voraussetzungen des Einzelversuchs, in dem das Volumen des äußeren und inneren Gelbetts von 6.7 ml mit insgesamt acht Zweiminuten-Fractionen erfaßt wurde, genügte jedoch die Elution über eine 5 ml-Säule zur Beurteilung der Fraktionierung. Durch Serumverdünnung konnte so eine Trennung der beiden wesentlichen Fractionen (proteingebundene und nicht Sephadex-gebundene) in einem Bereich von (0%) 10% bis 100% gebundener Aktivität, entsprechend einer UEBK von 0 bis 250 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ festgelegt werden (Abb. 13). Dieser Bereich entspräche den klinischen Erfordernissen, wie sie durch die TEBK mit einem Normbereich von 250 bis 400 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ gegeben sind (12, 22, 53). Vergleichbare Abhängigkeiten der proteingebundenen und nicht Sephadex-gebundenen Fraction voneinander ließen sich qualitativ auch nach zusätzlicher Inkubation des Serums mit nicht markiertem Eisen zeigen (Abb. 18 und 19).

Der Sephadex-gebundene Anteil der freien Eisenfraction war mit 0.02 mol/l Salzsäure vollständig eluierbar, so daß insgesamt eine quantitative Ausbeute der eingesetzten Aktivität resultierte. Eine Verschleppung von Aktivität bei wiederholter Elution findet demnach nicht statt, was die Wiederverwendbarkeit der Säulen erlaubt. Diese ist nach (49) bei Verwendung von 0.02 mol/l Salzsäure ohne Veränderung der Gelstruktur gewährleistet.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung der Eisenbindungskapazität in der klinischen Routinediagnostik sollte die Möglichkeit zur Automatisierung durch Anwendung der parallelen Säulenchromatographie genutzt werden. Mit Hilfe von ⁵⁹ Eisen-III wurden die erforderlichen Voraussetzungen untersucht. Auf die endgültige Ausarbeitung einer Methode zum jetzigen Zeitpunkt wurde verzichtet, da das Probenaufkommen für eine Automatisierung doch zu gering erschien. Überdies ist die Trennung von proteingebundenem Eisen und den freien Fraktionen (inneres Volumen und Sephadex-gebundenes Eisen) bei Verwendung praktikabler Säulengrößen nicht befriedigend.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AASA, R., B.G.MALMSTRÖM, P.SALTMAN, and T.VÄNNGÅRD:
The specific binding of iron(III) and copper(II) to transferrin and conalbumin.
Biochim.Biophys.Acta 75, 203 (1963)
2. AISEN, P., R.AASA, B.G.MALMSTRÖM, and T.VÄNNGÅRD:
Bicarbonate and the binding of iron to transferrin.
J.Biol.Chem. 242, 2484 (1967)
3. AISEN, P.:
Physics and physiology of transferrin.
J.Mt.Sinai Hosp. 37, 213 (1970)
4. BARBER, A.A., C.DEMPSTER, N.G.ANDERSON:
A gel filtration method for studies on protein-iron binding.
Clin.Chim.Acta 8, 143 (1963)
5. BOTHWELL, T.H., P.JACOBS, and R.KAMENER:
The determination of the unsaturated iron-binding capacity of serum using radioactive iron.
S.Afr.J.Med.Sci. 24, 93 (1959)
6. BROZOVICH, B.:
Method for the determination of the unsaturated iron-binding capacity of serum using radioactive iron and magnesium carbonate.
J.Clin.Path. 21, 183 (1968)
7. BURROWS, S.:
Comparison of methods designed to measure transferrin and iron-binding capacity of serum.
Amer.J.Clin. 47, 326 (1967)
8. CARAWAY, W.T.:
Macro and micro methods for the determination of serum iron and iron-binding capacity.
Clin.Chem. 9, 188 (1963)
9. COOK, J.D.:
An evaluation of adsorption methods for measurement of plasma iron-binding capacity.
J.Lab.Clin.Med. 76, 497 (1970)

10. COOK, J.D.:
Methods to determine plasma iron and total iron-binding capacity.
In: Hallberg, L., Harwerth, H.-G., Vanotti, A.: Iron deficiency.
Academic Press, London and New York, 1970, p.397.
11. CRICHTON, R.R.:
Struktur und Funktion von Ferritin.
Angew.Chem. 85, 53 (1973)
12. DIEM, K., C.LENTNER:
Documenta Geigy.
Wissenschaftliche Tabellen. 7. Aufl.
Basel, J.R.Geigy AG., Pharma.
13. FINCH, C.A.:
Diagnostic value of different methods to detect iron deficiency.
In: Hallberg, L., Harwerth, H.-G., Vanotti, A.: Iron deficiency.
Academic Press, London and New York, 1970, p. 409.
14. FLETCHER, J., E.R.HUEHNS:
Significance of the binding of iron by transferrin.
Nature 215, 584 (1967)
15. FLETCHER, J., E.R.HUEHNS:
Function of transferrin.
Nature 218, 1211 (1968)
16. GANZONI, A.M.:
Reticulocytes and plasma iron turnover in man.
Europ.J.Clin.Invest. 1, 84 (1970)
17. GANZONI, A.M., und P.FORRER:
Infekt und Eisen.
Schweiz.Med.Wschr. 102, 1642 (1972)
18. GANZONI, A.M., D.HAHN, B.BAVIERA:
Plasmacisentransport.
Schweiz.Med.Wschr. 102, 1609 (1972)
19. GELOTTE, B., P.FLODIN, and J.KILLANDER:
Fractionation of human plasma proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion-exchange chromatography.
Arch.Biochem.Biophys. Suppl. 1, 319 (1962)

20. HAECKEL, R., H.HAINDL, E.HULTSCH, P.MARISS, and M.OELLERICH:
Comparison of 8 different colorimetric, radiochemical and immunological procedures for the determination of iron binding capacity.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 529 (1963)
21. HAECKEL, R.:
A mechanized determination of serum iron concentration and iron binding capacity with the Beckman analyzer DSA 560.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 301 (1973)
22. HAUSMANN, K., R.KUSE, K.H.MEINECKE, H.BARTELS, H.C.HEINRICH:
Diagnostische Kriterien des prälatenten, latenten und manifesten Eisenmangels.
Klin.Wschr. 49, 1164 (1971)
23. HEBESTREIT, H.-P., J.HILGENFELDT, J.LÜTGEMEIER:
Eine neue nuklearmedizinische Methode zur Beurteilung der freien Eisenbindungskapazität im Serum.
Therapiewoche 50, 4450 (1972)
24. HEBESTREIT, H.-P., C.RUDOLPH, J.HILGENFELDT, J.LÜTGEMEIER:
Eine neue nuklearmedizinische Methode zur Beurteilung der totalen Eisenbindungskapazität im Serum.
Therapiewoche 51, 4970 (1973)
25. HEILMEYER, L.: Die Eisenspeicherkrankheit.
MMW 109, 677 (1967)
26. HEILMEYER, L.:
Der Eisenstoffwechsel.
In: Handbuch der Inneren Medizin, Blut und Blutkrankheiten, Teil 1.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1968
27. HEILMEYER, L., and HARWERTH, H.-G.:
Clinical manifestations of iron deficiency.
In: Hallberg, L., Harwerth, H.-G., Vanotti, A.: Iron deficiency.
Academic Press, London and New York, 1970, p. 375.
28. HEINEMANN, G.:
Eisen-, Kupfer- und Zinkanalysen unter Anwendung der Atom-Absorptions-Spektralphotometrie.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10, 467 (1972)

29. HEINRICH, H.C.:
Dimensionierung einer optimalen oralen
Eisenkompensationstherapie bei nicht
blutenden Patienten mit normaler
Gesamtkörper-⁵⁹Fe-Eliminationsrate.
Med.Klin. 68, 981 (1973)
30. HENRY, R.J., C.SOBEL, and N.CHIAMORI:
On the determination of serum iron and
iron-binding capacity.
Clin.Chim.Acta 3, 523 (1958)
31. HERBERT, V., C.W.GOTTLIEB, K.-S.LAU, M.FISHER,
N.R.GEVIRTZ, and L.R.WASSERMAN:
Coated charcoal assay of unsaturated
iron-binding capacity.
J.Lab.Clin.Med. 67, 855 (1966)
32. HORN, K., J.HENNER, O.A.MÜLLER, P.C.SCRIBA:
Mechanisierte Hormonanalytik mittels
simultaner Säulenchromatographie.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13, 173 (1975)
33. HORNE, C.H.W., P.C.HOWIE, R.J.WEIR, R.B.GODIE:
Effect of combined oestrogen-progesteron
oral contraceptives on serum levels of
a-2-macroglobulin, transferrin, albumin,
and IgD.
Lancet, 1970, I, 49.
34. JANDL, J.H., J.H.KATZ:
The plasma-to-cell cycle of transferrin.
J.Clin.Invest. 42, 314 (1963)
35. KOCH, C.-D., U.RITTER:
Bestimmung von Serum-Eisenbindungs-
kapazität oder Transferrin im Routine-
laboratorium ?
Diagnostik 7, 766 (1974)
36. KUYPERS, A.M.J., and R.J.M. van OERS:
A simple method for the semi-micro
determination of unsaturated iron binding
capacity (UIBC).
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 172 (1973)
37. LAMERZ, R., A.FATEH-MOGHADAM:
Quantitative Immunglobulinbestimmungen.
Grundlagen-Methodik-Bewertung.
S.Med.Lab. 22, 243 (1969)

38. LAMERZ, R., A.FATEH-MOGHADAM, M.KNEDEL:
Zur quantitativen immunologischen
Bestimmung von Serumproteinen.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 491 (1973)
39. LAURELL, C.B.:
Serumproteine und Eisentransport.
In: Keiderling, W.: Eisenstoffwechsel.
Stuttgart, Georg Thieme 1959.
40. LEHMANN, H.P., and A.KAPLAN:
Use of an anion-exchange column to
determine serum iron-binding capacity.
Clin.Chem. 17, 941 (1971)
41. LIPSCHITZ, D.A., J.D.COOK, and C.A.FINCH:
A clinical evaluation of serum ferritin
as an index of iron stores.
N.Engl.J.Med. 290, 1213 (1974)
42. MALMSTRÖM, B.G.:
Biochemical functions of iron.
In: Hallberg, L., Harwerth, H.-G.,
Vanotti, A.: Iron deficiency.
Academic Press, London and New York,
1970, p. 9.
43. MANCINI, G., A.O.CARBONARA, and J.V.HEREMANS:
Immunochemical quantitation of antigens
by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2, 235 (1965)
44. NAJEAN, Y., C.DRESCH, and M.BOULARD:
Regulation of the iron transport
compartment.
In: Hallberg, L., Harwerth, H.-G.,
Vanotti, A.: Iron deficiency.
Academic Press, London and New York,
1970, p. 21.
45. NIELSEN, I.:
A gel filtration method for determining
total iron-binding capacity in serum.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 6, 103 (1968)
46. OLSEN, E.D., P.I.JATLOW, F.J.FERNANDEZ, and H.L.KAIN:
Ultramicro method for determination of
iron in serum with the graphite furnace.
Clin.Chem. 19, 326 (1973)

47. OLSON, A.D., and W.B.HAMLIN:
A new method for serum iron and
total iron-binding capacity by atomic
absorption spectrophotometry.
Clin.Chem. 15, 438 (1969)
48. PETERS, T., T.GIOVANIELLO, L.APT, and J.F.ROSS:
A new method for the determination of
serum iron-binding capacity.
J.Lab.Clin.Med. 48, 274 (1956)
49. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala:
Sephadex - Gel filtration in theory
and practice (1973)
50. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala:
Separation News (March, 1973)
51. PRONK, C., H.OLDENZIEL, and H.C.LEQUIN:
A method for determination of serum iron,
total iron binding capacity and iron
in urine by atomic absorption spectro-
photometry with manganese as internal
standard.
Clin.Chim.Acta 50, 35 (1974)
52. RAMSAY, W.N.M.:
The determination of the total iron-
binding capacity of serum.
Clin.Chim.Acta 2, 221 (1957)
53. RENTSCH, I.:
Quantitative immunologische Transferrin-
bestimmung.
Klin.Wschr. 47, 433 (1969)
54. RICK, W.:
Klinische Chemie und Mikroskopie.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1972
55. SAITO, H.:
New method for determining total iron-
binding capacity of serum (TIBC) with
radioiron by eliminating iron from
transferrin.
J.Nucl.Med. 12, 489 (1971)
56. SCHMIDT, W.:
Die serienmäßige Bestimmung von Kupfer und
Eisen im Blutserum mit Hilfe der Atomab-
sorptions-Spektralphotometrie.
Z.Anal.Chem. 243, 198 (1968)

57. SPRAGUE, S., and W.SLAVIN:
Determination of iron, copper and zinc
in blood by an atomic absorption method
requiring only dilution.
At.Absorption Newslett. 4, 228 (1965)
58. TAVENIER, P., and H.B.A.HELLENDORRN:
A comparison of serum iron values deter-
mined by atomic absorption and by some
spectrophotometric methods.
Clin.Chim.Acta 23, 47 (1969)
59. TRINDER, P.:
The improved determination of iron in
serum.
J.Clin.Pathol. 9, 170 (1956)
60. WELZ, B.:
Atomabsorptionsspektroskopie.
Weinheim/Bergstr., Verlag Chemie 1972.
61. YEH, Y.-Y., and P.ZEE:
Micromethod for determining total iron-
binding capacity by flameless atomic
absorption spectrophotometry.
Clin.Chem. 20, 360 (1974)
62. ZETTNER, A., and A.H.MENSCH:
The use of atomic absorption spectroscopy
in hemoglobinometry.
Am.J.Clin.Path. 48, 225 (1967)
63. ZETTNER, A., L.SYLIVIA, and L.CAPACHO-DELGADO:
The determination of serum iron-binding
capacity by atomic absorption spectrometry.
Am.J.Clin.Path. 45, 533 (1966)

Lebenslauf

Am 14. Juli 1940 wurde ich als Sohn des Arztes Dr.med. Hermann Gulde und seiner Frau Dorothea, geb. Mahrenholz in Berlin geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Ofterdingen, Kreis Tübingen und in München, als weiterführende Schule das Realgymnasium in Icking/Isartal bis zur Ablegung der Reifeprüfung im Jahr 1959. Unmittelbar anschließend begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität München mit dem Medizinstudium und legte hier 1966 das Staatsexamen ab. Im Jahr 1967 heiratete ich Christiane Konradt. Seit der Approbation im Juli 1969 arbeite ich als Assistent an der II. Medizinischen Klinik/Innenstadt der Universität München.

